

⑫ 公開特許公報 (A) 平4-80202

⑬ Int. Cl. 5

C 08 B 37/08
A 61 K 31/725
C 08 B 37/10

識別記号

ADU Z

庁内整理番号

7624-4C
9164-4C
7624-4C

⑭ 公開 平成4年(1992)3月13日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全15頁)

⑮ 発明の名称 燐脂質結合グリコサミノグリカン

⑯ 特 願 平2-193818

⑰ 出 願 平2(1990)7月24日

⑱ 発 明 者 桜 井 勝 清 東京都東大和市立野3丁目1253番地 生化学工業株式会社
東京研究所内

⑲ 発 明 者 杉 浦 信 夫 愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又21番地 愛知医科大学分
子医科学研究所内

⑲ 発 明 者 木 全 弘 治 愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又21番地 愛知医科大学分
子医科学研究所内

⑲ 発 明 者 鈴 木 旺 愛知県愛知郡長久手町岩作字雁又21番地 愛知医科大学分
子医科学研究所内

⑳ 出 願 人 生化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

㉑ 代 理 人 弁理士 津 国 肇 外1名

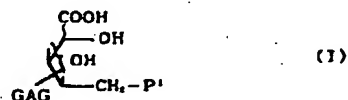
明 細 書

1. 発明の名称

燐脂質結合グリコサミノグリカン

2. 特許請求の範囲

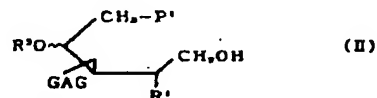
1. 一般式



を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、C、EもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキシサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、P'は1級アミノ基を有する燐脂質を示す。

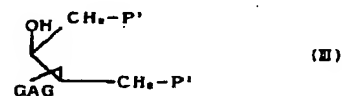
2. 一般式



を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、R'はOH又はNHCOCH₃を示し、R''は水素又はSO₃Hを示し、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸AもしくはK又はデルマタン硫酸から還元性末端のヘキシサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基、或いはケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、P'は1級アミノ基を有する燐脂質を示す。

3. 一般式



を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

の塩。

上記式中、GAGはケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、P'は1級アミノ基を有する磷脂質を示す。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、癌転移抑制剤として有用な磷脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩に関する。

〔従来の技術〕

癌転移は、血管内やリンパ管内に流出した癌細胞が、血管内皮細胞やその下の基底膜と呼ばれる血管内皮細胞の細胞外マトリックスと接着し、接着した癌細胞が細胞外マトリックス内に浸潤、透過して新しい組織に転移巣をつくることが知られている。例えば S. Korach らは (Cancer Research 46, 3624-3629, (1986)) 癌細胞のクローニングで高転移性細胞と低転移性細胞の群に分け、培養内皮細胞に対する in vitro での接触試験で、高転移性の癌細胞は高い接着率を示し、

低転移性のものは低い接着率を示すことから、血管内皮細胞やその細胞外マトリックスに対する接着性が癌の転移と深くかかわっていることを報告している。

また、細胞外マトリックス成分であるフィブロネクチンの細胞接着部位にあるペプチド・GRGDSは、拮抗的に細胞と細胞外マトリックスとの結合を阻害する。山田らは (Science 233, 467-470, (1986)) このペプチド・GRGDSがB16F10細胞のマウスにおける肺転移を抑制することを示している。このことから、非常に微量で細胞接着阻害活性を持つ物質は癌転移抑制剤として利用し得ることを示唆している。

〔発明が解決しようとする課題〕

本発明は、磷脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩が、上記の癌細胞の血管内皮細胞や細胞外マトリックスへの接着を阻害することにより、癌の転移を抑制する知見を得て本発明をなした。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は、下記磷脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩である。

グリコサミノグリカンは表1に示すように、D-グルコサミン又はD-ガラクトサミンと、D-グルクロン酸、L-イズロン酸及び/又はD-ガラクトースの2糖又は4糖の繰り返し単位より構成されている長い鎖状の多糖であり、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸D、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸及びケラタン硫酸、ケラタンポリ硫酸が知られている。

表 1

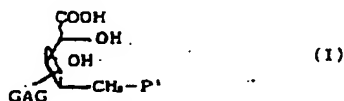
グリコサミノグリカン	ヘキソサミン	ウ ロ ン 酸
ヒアルロン酸 (MW 1000-1000万)	GlcNAc	GlcUA
コンドロイチン (MW 1000-10万)	GalNAc	GlcUA
コンドロイチン硫酸A (MW 1000-10万)	GalNAc (4S)	GlcUA
コンドロイチン硫酸C (MW 1000-10万)	GalNAc (6S)	GlcUA
コンドロイチン硫酸D (MW 1000-10万)	GalNAc (6S)	GlcUA (2S)
コンドロイチン硫酸E (MW 1000-10万)	GalNAc (4S, 6S)	GlcUA
コンドロイチン硫酸K (MW 1000-10万)	GalNAc (4S)	GlcUA (3S)
コンドロイチンポリ硫酸 (MW 1000-15万)	GalNAc (S)	GlcUA (S)
デルマタン硫酸 (MW 1000-2万)	GalNAc (5S)	IduUA, GlcUA
ヘパリン (MW 1000-2万)	GlcNS (6S)	GlcUA, IduUA (2S)
ヘパラン硫酸 (MW 1000-2万)	GlcNS (NAc, S)	GlcUA, IduUA (2S)
ケラタン硫酸 (MW 2000-2万)	GlcNAc (6S)	Gal
ケラタンポリ硫酸 (MW 1000-2万)	GlcNAc (6S)	Gal (6S)

GlcNAc : N-アセチルD-グルコサミン
 GalNAc : N-アセチルD-ガラクトサミン
 GlcNS : D-グルコサミンN-硫酸
 GlcUA : D-グルクロン酸
 IduUA : L-イズロン酸
 Gal : D-ガラクトース
 S : o-硫酸

本発明の燐脂質結合グリコサミノグリカンは、その塩であることができ、好ましくはナトリウム、カリウムのようなアルカリ金属塩；カルシウム、マグネシウムのようなアルカリ土類金属塩；トリアルキルアミン、ピリジンのようなアミン塩であることができる。

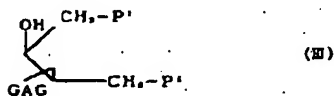
本発明の燐脂質結合グリコサミノグリカン、次のものを包含する。

一般式



を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、C、EもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分

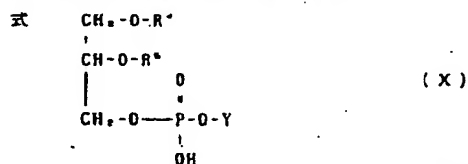


を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、GAGはケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、P¹は1級アミノ基を有する燐脂質を示す。

グリコサミノグリカンの分子量は好ましくは前記表1に記載のものが用いられる。

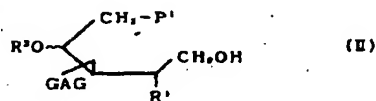
上記式(I)、(II)及び(III)のP¹で示される1級アミノ基を有する燐脂質としては、



(式中、R^{*}及びR^{*}はそれぞれ水素、-CH=CHR^{*}又は-COR^{*}(R^{*}及び

を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、P¹は1級アミノ基を有する燐脂質を示す。

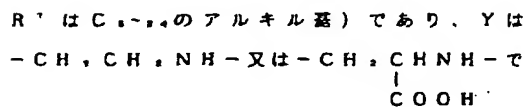
一般式



を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、R¹はOH又はNHCOCH₃を示し、R²は水素又はSO₃Hを示し、GAGはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸AもしくはK又はデルマトン硫酸から還元性末端のヘキソサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基、或いはケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示し、P¹は1級アミノ基を有する燐脂質を示す。

一般式



ある)

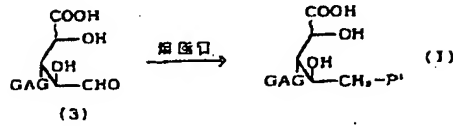
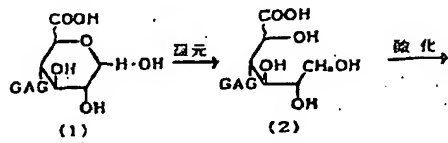
で示されるものが用いられる。特にR^{*}及びR^{*}がともにヘキサデカノイル又はオクタデカノイルのような-COR^{*}であるか、R^{*}が-CH=CHR^{*}でR^{*}が-COR^{*}であるものが好ましい。

以下に、本発明の燐脂質結合グリコサミノグリカンの製造法について詳しく説明する。

還元末端限定酸化法

この方法は、グリコサミノグリカンの還元性末端のウロン酸部分もしくはガラクトース部分又はヘキソサミン部分を還元及び部分酸化することにより開裂させてアルデヒドを形成させ、このアルデヒドと燐脂質の1級アミノ基との間の還元的アルキル化反応により、燐脂質結合グリコサミノグリカン製造する方法である。この方法を反応式で示せば次のとおりである。

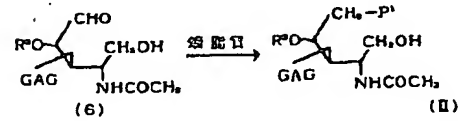
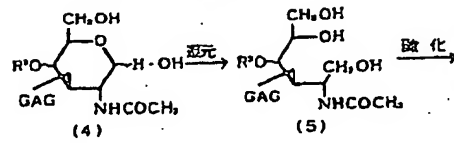
(A) 還元性末端糖のグルクロン酸又はイズロン糖に反応する場合



(P' は1級アミノ基を有する燐脂質を示す)

還元性末端がC-2にOHを有するD-グルクロン酸又はL-イズロン糖である式(1)のヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリンを原料として使用したとき、上記反応式に従い、式(I)の燐脂質結合グリコサミノグリカンが製造できる。

(B) 還元性末端糖のグルコサミン又はガラクトサミンに反応する場合

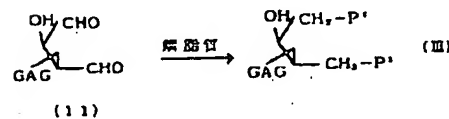
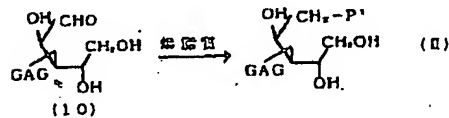
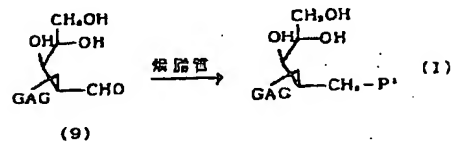
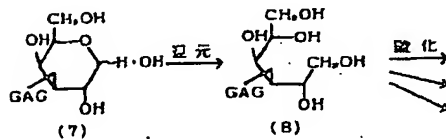


(式中、R' は前述と同じ、P' は1級アミノ基を有する燐脂質を示す)

還元性末端のC-5にCH₂OHを有するグルコサミン又はガラクトサミンである式(4)のヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸又はデルマタン硫酸を原料として使用したとき、上記反応式に従い、式(II)の燐脂質結合グリコサミノグリカンが製造できる。

(C) 還元性末端糖のガラクトースに反応する場合

場合



(式中、P' は1級アミノ基を有する燐脂質を示す)

還元性末端糖がガラクトースである式(7)のケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸を原料として使用したとき、上記反応式に従い、式(I)、(II)及び(III)の燐脂質結合グリコサミノグリカンが製造できる。

上記(A)、(B)及び(C)の方法においては、先ず、上記式(1)、(4)及び(7)で示されるグリコサミノグリカンを還元して還元性末端糖部分を開裂させて式(2)、(5)及び(8)の化合物とする。

この還元を使用する還元剤としては、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウムなどの水素化ホウ素アルカリ塩等を用いることができる。

また、上記還元反応における溶媒は、水又は0.05Mホウ酸緩衝液(pH8.3)等を用いることができる。

また還元反応温度は、通常10~30℃、好ましくは15~25℃で行うことができる。

還元剤の使用量は、その種類等によっても異なる。

るが、一般には式(1)、(4)又は(7)の化合物1モルに対して5~50当量、好ましくは25~30当量の範囲である。

得られる式(2)、(5)及び(8)の化合物を次いで即時的に酸化すると、式(3)、(6)、(9)、(10)及び(11)のアルデヒド化合物が生成する。

この酸化反応に使用しうる酸化剤としては、過ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸カリウムなどの過ヨウ素酸アルカリ塩等を用いることができる。

酸化剤の使用量は、式(2)、(5)又は(8)の化合物1モルに対して1~10当量、好ましくは3~6当量の範囲である。

酸化反応温度は、0~10℃、好ましくは0~4℃の範囲で行うことができる。

生成した(3)、(6)、(9)、(10)及び(11)のアルデヒド化合物は、それ自体既知の還元的アルキル化法に従い、燐脂質の1級アミノ基と反応させることができ、これによって本発

明が目的とする一般式(I)、(II)及び(III)で示される燐脂質結合グリコサミノグリカンを得ることができる。

上記反応に用いることのできる燐脂質としては、L-(α -ホスファチジル)エタノールアミン、DL-ホスファチジル-L-セリン、エタノールアミンプラスマロゲン、セリンプラスマロゲン等を挙げることができる。

上記還元的アルキル化反応は、水、0.05Mリン緩衝液(pH7.0)又はジメチルホルムアミドのような溶媒中において、式(3)、(6)、(9)、(10)又は(11)のアルデヒド化合物とクロロホルム等に溶解した燐脂質とを混合して均一な溶液にし、通常15~60℃の温度で反応させ、それと同時に又はその後に、例えばシアノ水素化ホウ素ナトリウム等の還元剤を用いて還元することにより一般式(I)、(II)及び(III)の化合物を製造することができる。

本発明の一般式(I)、(II)及び(III)で示

される燐脂質結合グリコサミノグリカンの燐脂質の含有量は、0.05~50%、好ましくは2~10%の範囲である。

以上に述べた各種の方法で製造される燐脂質結合グリコサミノグリカンの分離、精製方法としては、反応液に酢酸ナトリウム飽和エタノールを加えて生じた沈澱物を濾取することで未反応の燐脂質又は脂質を除き、さらに該沈澱物を疎水クロマトに負荷し、酢酸アンモニウム、塩化アンモニウム又は塩化ナトリウム等の塩の水溶液で洗浄することで未反応のグリコサミノグリカンを除く。その後、該疎水クロマトに吸着した燐脂質結合グリコサミノグリカンを10~50%メタノール水溶液で溶出する方法で行うことができる。

本発明の燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその薬学的に許容される塩を、固体又は液体の医薬用担体又は希釈剤、即ち、賦形剤、安定剤等の添加剤とともに含む製剤とすることが好ましい。

燐脂質結合グリコサミノグリカンの塩は水溶性

であるため、注射剤として用いる場合に最適である。該医薬製剤において、前記有効成分の担体成分に対する割合は、1~90重量%の間で変動させる。

剤形及び投与形態としては、顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、丸剤もしくは液剤等の剤形にして、又は原來のまま経口投与してもよいし、注射剤として静脈内投与、筋肉内投与又は皮下投与してもよい。また、坐剤、軟膏剤、パップ剤、貼付剤、リネメント剤、ローション剤等の剤形にして、外用剤として用いることもできる。また、注射用の粉末にして、用時調製して使用してもよい。

経口、経腸、非経口もしくは局所投与に適した医薬用の有機又は無機の、固体又は液体の担体もしくは希釈剤を、本発明の燐脂質又は脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩を含む医薬製剤を調製するために用いることができる。水、ゼラチン、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、タルク、動植物油脂、ベンジルアルコール、

ガム、ポリアルキレングルコール、石油樹脂、やし油、ラノリン又は医薬に用いられる他のキャリアー（担体）は全て、本発明品の担体として用いることができる。また、安定剤、湿潤剤、乳化剤や、浸透圧を変えたり、製剤の適切なpHを維持するための塩類を補助製剤として適宜用いることもできる。

顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤又はカプセル剤の場合には、該医薬製剤は本発明品を5～80重量%含有していることが好ましく、液剤の場合には、1～30重量%含有していることが好ましい。また、注射剤の場合は1～10重量%、坐剤の場合は1～50重量%が好ましい。局所投与用である軟膏剤又はパップ剤等として用いる場合は、0.1～10重量%含有していることが好ましい。

臨床投与量は、経口投与の場合、成人に対し有効成分として、1日量100～2000mgを内服することが好ましいが、年齢、症状により適宜増減することも可能である。前記1日量を1回、又

は適当な間隔をおいて2もしくは3回に分けて投与することが好ましい。

また、注射剤として用いる場合には、成人に対し有効成分として、1回量10～1000mgを投与することが好ましく、軟膏剤又はパップ剤等として用いる場合は、前記含有割合のものを適量患部に塗布することが好ましい。

【発明の効果】

本発明品の燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩は、細胞接着阻害作用を有し、かつ毒性もないので癌転移抑制剤として有用である。

【実施例】

次に実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、実施例に限定されるものではない。

以下の実施例において、燐脂質結合グリコサミノグリカンのリン含量、燐脂質含量、及びグリコサミノグリカン（GAG）含量は、以下の方法で測定した。

測定法

1. GAGの定量

(1) ウロン酸を含有するGAG：カルバゾール硫酸法（Bitter-Muir法）ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 4, 330-334 (1962)

(2) ガラクトースを含有するケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸：アンスロン法 Biochem. J. 50, 298-303 (1952)

2. 燐脂質の定量

(1) リンの定量：モリブデンブルー法、無機応用比色分析、4、共立出版株式会社、編纂代表 平野四蔵 130～135頁

(2) 脂肪酸の定量：10～50mgのGAG-脂質を10mlの1N-水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、100℃で1時間加水分解する。反応液を1N-塩酸水溶液で酸性にした後、クロロホルムで抽出し、クロロホルム相を水で洗浄する。脱水ボウ硝で乾燥後、減圧下で溶媒を除去。残渣に3%塩酸（ガス）含有メタノールを加え、封管中、100℃で3時間加熱後、石油エーテルで3回抽出する。石油エーテルを3回水洗し、混入

た塩酸を除き、脱水ボウ硝で乾燥後、減圧濃縮し、次の（GLC）用試料とする。

気相液相クロマトグラフィー（GLC）

GC-15A（島津製作所）

充填剤：PEG-HT 5% Uniport HP 60/80

ガスクロ工業㈱

運転条件：試料気化室温度 350℃

カラム温度：190～200℃

カラム：3φ×2m

流速：N₂ 45 ml/min.

実施例1

還元末端限定酸化法による燐脂質結合グリコサミノグリカンの製造

(1) 還元末端限定酸化グリコサミノグリカンの製造

1) 還元末端残基開環ヒアルロン酸の製造

ヒアルロン酸（鶏冠由来、MW 1万：HA1）2000mgを200mlの0.05Mホウ酸塩緩衝液（pH8.3）に溶解し、182mgの水素化ホウ酸ナトリウムを加えて室温で5時間反応させた。

特開平4-80202 (7)

酢酸でpH4.5にしてエタノールを加えて生成物を沈澱させ、次いで生成物をエタノールで洗浄した。これによりロット番号100の還元末端残基開環ヒアルロン酸(R-HA1)を1800mg得た。

2) 還元末端限定酸化ヒアルロン酸の製造

1700mgのR-HA1(ロット番号100)を250mlの40mMイミダゾール(pH6.5)に溶解し、0℃で139.96mgの過ヨウ素酸ナトリウムを加え、1時間反応させた。反応液にエタノールを加えて生成物を沈澱させ、次いでエタノールで洗浄した。これによりロット番号200の還元末端限定酸化ヒアルロン酸(O-HA)1600mgを得た。

3) 他のグリコサミノグリカンの還元末端限定酸化物(O-GAG)の製造

ヒアルロン酸(鶏冠由来、MW5万:HA5、MW15万:HA15)。

コンドロイチン(コンドロイチン硫酸Aから酸性メタノール溶液で脱硫酸したもの、MW1.5万:CH)。

コンドロイチン硫酸C(軟軟骨由来、MW1万:CS(S1)、MW3万:CS(S3)、MW6万:CS(S6))。

コンドロイチン硫酸A(軟軟骨由来、MW3万:CS(W))。

デルマタン硫酸(豚皮由来、MW1.5万:DS)。

ヘパリン(豚小腸由来、MW1.5万:Hep)。

ケラタン硫酸(牛角膜由来、MW1.5万:KS)。

を原料として上記の1)に準じて表2の条件で還元末端残基開環グリコサミノグリカン(R-GAG)を製造した。ひきつづき、上記の2)の方法に準じて表3の条件で還元末端限定酸化グリコサミノグリカン(O-GAG)を製造した。

表 2

ロット番号	生成物	反応条件 GAG/NaBH ₄ (mg/mg)	収量 (mg)
100-2	R-HA5	5000/94.58	4720
100-3	R-HA15	1000/6.31	971
101	R-CH	1000/63.05	867
102	R-CS(S1)	1000/94.58	880
102-2	R-CS(S3)	1000/31.50	897
102-3	R-CS(S6)	1000/15.76	869
103	R-CS(W)	1000/31.50	823
104	R-DS	150/9.46	130
105	R-Hep	1000/63.05	772
107	R-KS	20/1.28	14.6

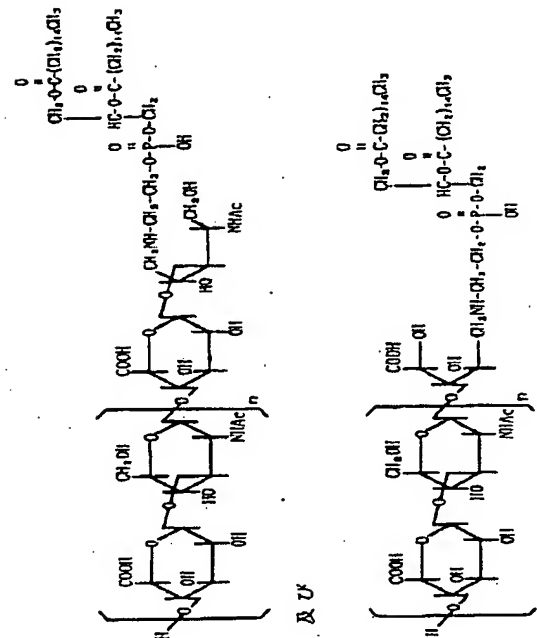
表 3

ロット番号	生成物	反応条件 R-GAG/NaIO ₄ (mg/mg)	収量 (mg)
200-2	O-HA5	4500/77.0	4310
200-3	O-HA15	900/5.14	815
201	O-CH	800/45.65	766
202	O-CS(S1)	800/68.48	715
202-2	O-CS(S3)	800/22.83	774
202-3	O-CS(S6)	800/11.41	699
203	O-CS(W)	800/22.83	697
204	O-DS	100/5.71	82
205	O-Hep	700/39.95	666
207	O-KS	10/0.57	7

(2) L-(α -ホスファチル) エタノールアミン・ジバロミトイル結合グリコサミノグリカン (GAG-PPEADP) の製造

1) L-(α -ホスファチル) エタノールアミン・ジバロミトイル結合ヒアルロン酸の製造

1000 mg のロット番号 200 の 0-HA を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 100 ml に溶解し、クロロホルム：メタノール = 2 : 1 の溶媒で (1 mg/ml) に溶解した L-(α -ホスファチル) エタノールアミン・ジバロミトイル (PPEADP) を 69.2 ml 加えた。さらに、メタノールを加えて均一な溶液にして、50℃で1時間反応させ、その後、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを 2.5 mg を加えた。2時間50℃で反応させ、減圧下濃縮し、酢酸飽和のエタノールを5倍量加えて生じた沈澱を濾取した。沈澱を 0.3 M 塩化アンモニウム塩で溶解し、疎水クロマトカラム (TSK gel フェニルトヨパール 650M 400 ml) に吸着し、十分に 0.3 M 塩化アンモニウム水溶液で洗浄し、30%メタノール水溶液で溶出した。素通り及び洗浄画分に未反応の HA が溶出され、30%メタノール水溶液の画分に目的とする本品が溶出した。30%メタノール水溶液溶出画分を減圧下濃縮し、透析で脱塩後、凍結乾燥してロット番号 300 の白色粉末を得た。



n : 平均 24

収量：40 mg

PPEADP 含量：6.21%

ヒアルロン酸含量：62.12%

疎水クロマトグラフィ：図-1 に示す。

疎水クロマトグラフィの条件

カラム：TSK gel フェニル 5PW
(7.5 ϕ \times 7.5 cm)

溶媒：0 ~ 5 分 0.3 M 塩化アンモニウム
水溶液

5 ~ 50 分 30% メタノール水溶液

溶出速度：0.5 ml/分

圧：7 kg/0.5 cm²

分画容量：1 ml/管

検出：0 D_{280nm}

検体：100 μ l (1 mg/ml 0.3 M 塩化アンモニウム水溶液)

2) その他の燐脂質結合グリコサミノグリカンの製造

表 3 に示した 0-GAG と PPEADP とを表 4 に示した条件で、上記 (2) - 1) の方法に準じて燐脂質結

合グリコサミノグリカンを製造した。得られた生成物の分析値を表 4 に示した。

表 4

ロット番号	生成物	反応条件 O-GAG/PPEADP/NaBH ₄ CN	吸光度 (mg)	PPEADP (%)	GAG (%)
300-2	R-HA5-PPEADP	1000/19.84/5.03	42	1.33	63.43
300-3	R-HA15-PPEADP	700/3.23/1.17	35	0.46	63.35
301	CH-PPEADP	700/32.29/1.73	30	4.27	59.10
302	CS(S1)-PPEADP	700/48.44/17.60	36	5.89	63.04
302-2	CS(S3)-PPEADP	700/16.15/5.89	29	2.22	65.52
302-3	CS(S6)-PPEADP	500/5.77/2.09	20	1.07	67.13
303	CS(H)-PPEADP	500/11.53/4.19	22	2.23	67.48
304	DS-PPEADP	50/2.31/0.84	3.7	4.21	66.10
305	Hep-PPEADP	500/23.07/8.38	3.8	4.30	74.65
306	IIS-PPEADP	20/0.92/0.34	3.3	4.09	68.40
307	KS-PPEADP	7/0.33/0.12	0.5	3.97	66.24

参考例 1

フィブロネクチンを予め塗布した培養皿に塗布した燐脂質結合グリコサミノグリカンの BHK 21 細胞の接着に対する効果

96 穴培養皿を 5 μ g/ μ l シス血漿フィブロネクチン 100 μ l で塗布した後、洗浄し、実施例 1 で得た各種燐脂質結合グリコサミノグリカン 100 μ l/穴を表 5 に示す各濃度で塗布した。

別に、100 μ m 径の培養皿に培養した BHK 21 細胞（新生ハムスター腎細胞）を 0.1 μ g/ μ l の濃度のトリプシン溶液 5 μ l を加え、37℃で 5 分間処理した。次いで、1 μ g/ μ l の大豆トリプシンインヒビター溶液 5 μ l を加え、トリプシンを不活性化した後、遊離した細胞を遠心により集めた。細胞は 2 回洗浄後、1 μ l あたり 1×10^4 個細胞となるように単一細胞懸濁液とした。

得られた単一細胞懸濁液 100 μ l (1×10^4 個細胞) を、上記フィブロネクチンと燐脂質結合グリコサミノグリカンを塗布した培養皿に加え、

37℃で 1 時間処理した。接着しなかった細胞を洗浄した後、接着した細胞を 2% ホルムアルデヒドで固定し、直接位相顕微鏡で観察して、その細胞数をカウントした。

結果を表 5 に示す。表 5 は、各濃度における細胞接着の要約を示す。値は 3 回ないし 4 回の測定の平均を示し、誤差（標準偏差）もあわせて表した。

なおそれぞれの遊離グリコサミノグリカンおよび未結合の燐脂質のみでは高濃度にしても全く細胞接着阻害効果を示さなかった。

表 5

μ g/ μ l	ロット番号	302-3 (CS(S6)-PPEADP)
1	1	91.4% \pm 6.8%
2	2	60.9% \pm 4.5%
5	5	23.0% \pm 0.2%
10	10	1.3% \pm 1.2%

参考例 2

各種培養細胞の細胞接着物質に対する燐脂質結合グリコサミノグリカンの接着阻害効果

実施例 1 で得た磷脂質結合グリコサミノグリカンについて、BHK 21 細胞（新生ハムスター腎細胞）、CEF（ニワトリ胚線維芽細胞）、B16F10（高転移性マウスメラノーマ細胞）、CHO（チャイニーズハムスター卵巣細胞）、及び b a E C（ウシ大動脈内皮細胞）の各種細胞群に対しての、フィブロネクチン（FN）、ラミニン（LN）、I 型コラーゲン（Col1）及びビトロネクチン（VN）による接着に対する阻害効果を検討した。

各 5 μ l/ml のウシ血清フィブロネクチン、マウス EHS 腫瘍細胞由来ラミニン、ラット腱由来 I 型コラーゲン、及びウシ血清ビトロネクチンをそれぞれ 96 穴培養皿に塗布し、参考例 1 と同様にして、実施例 1 で得た磷脂質結合グリコサミノグリカンを塗布した後、それぞれ BHK 21 細胞、CEF 細胞、B16F10 細胞、CHO 細胞、及び b a E C 細胞の単一細胞懸濁液 100 μ l（ 1×10^4 個細胞）を加え細胞接着の変動を見た。対照として磷脂質結合グリコサミノグリカン

を添加せず、接着物質のみの細胞接着を 100% とした。結果を表 6 に示す。

なお、表 6 中で相対接着細胞数として、全くあるいは殆ど細胞接着しなかった場合（0~10% 未満）を－、10~30% 未満を＋、30~50% 未満を＋＋、50~70% 未満を＋＋＋、70~90% 未満を＋＋＋＋、そして 90~100% の細胞が接着した場合を＋＋＋＋＋と半定量的に表した。

他の磷脂質結合グリコサミノグリカンの細胞接着阻害の結果

表 6

ロット番号	用量 (μ l/ml)	細胞 / 接着物質 (5 μ l/ml)											
		BHK 21		CEF		B16F10		CHO		LN		FN	
300 (RA1-PPEADP)	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
301 (CH-PPEADP)	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
302 (CS(S1)-PPEADP)	10	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
302-2 (CS(S3)-PPEADP)	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
302-3 (CS(S6)-PPEADP)	10	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
303 (CS(N)-PPEADP)	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
304 (DS-PPEADP)	100	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
305 (Hep-PPEADP)	10	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
RA1	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
RA5	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
RA15	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
CH	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
CS(S1)	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
CS(S3)	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
CS(S5)	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
CS(N)	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
DS	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Hep	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
NS	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
CPS (111)	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
PPEADP	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

4. 図面の簡単な説明

図 1 は実施例 1 - (2) - 1) の脂質結合グリコサミノグリカンの疎水クロマトグラフィーを示す。

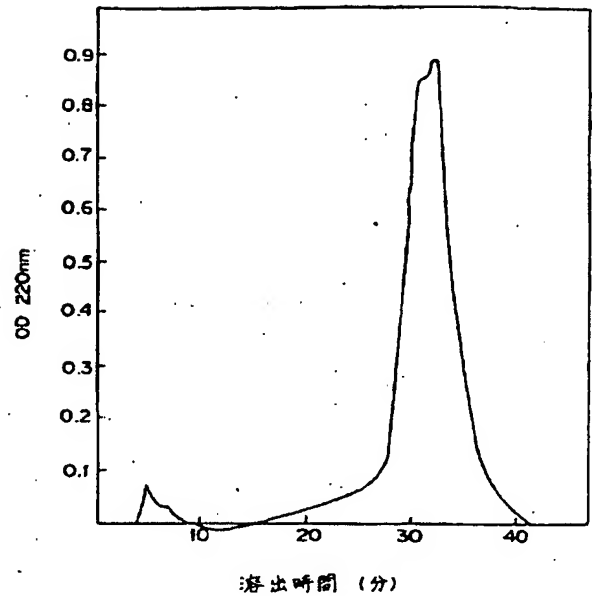


図 1

手続補正書

平成 3 年 7 月 23 日

特許庁長官 櫻 沢 巨 殿

1. 事件の表示

平成 2 年特許願第 193818 号

2. 発明の名称

脂質結合グリコサミノグリカン

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人
名 称 生化学工業株式会社

4. 代理人

住 所 〒107 東京都港区赤坂 2-10-8 第一信和ビル
氏 名 弁護士 (7866) 篠 田 隆 夫
電話 (3586) 1738 ~ 9

5. 補正命令の日付 目録

6. 補正の対象 明細書の特許請求の範囲及び発明の詳細な説明の各欄

7. 補正の内容

I. 特許請求の範囲の欄

別紙 1 のとおり訂正する。

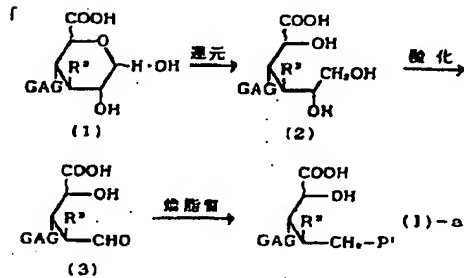
II. 発明の詳細な説明の欄

(1) 明細書 6 頁表 1 デルマタン硫酸のヘキサミンの欄の「Ga2NAc (5S)」を「Ga2NAc (4S)」と訂正する。

(2) 同 6 頁末行の「o-硫酸」を「O-硫酸」と訂正する。

(3) 同 7 頁 9 行 ~ 9 頁 7 行を別紙 2 のとおり訂正する。

(4) 同 11 頁 3 行 ~ 11 頁 4 行の反応式を次のとおり訂正する。

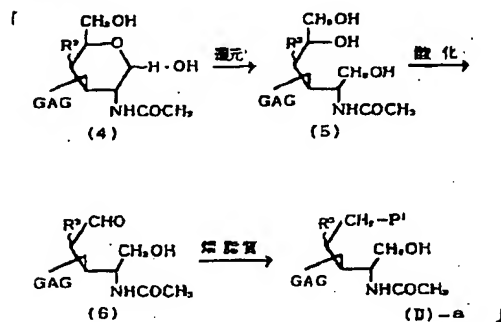


方式 正
修正

(5) 同 1 頁 5 行の「P' は 1 級アミノ基を有する燐脂質を示す」の前に「R' は前述と同じ。」を挿入する。

(6) 同 1 頁下から 2 行の「式 (I)」を「式 (I) - a」と訂正する。

(7) 同 1 2 頁 3 ~ 4 行の反応式を次のとおり訂正する。

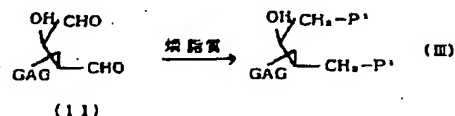
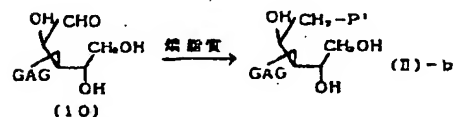
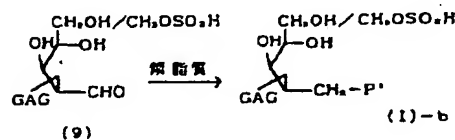
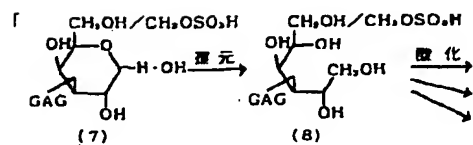


(8) 同 1 2 頁下から 3 行の「式 (II)」を「式 (II) - a」と訂正する。

(9) 同 1 3 頁 2 ~ 5 行の反応式を次のとおり訂正する。

(11) 同 1 6 頁下から 1 行と 2 行の間に次の記載を挿入する。

「上記還元末端限定酸化法で製造される化合物を表 A に具体的に示す。



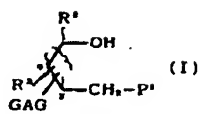
(10) 同 1 4 頁 3 ~ 4 行の「(I)」、「(II)」を「(I) - b」、「(II) - b」と訂正する。

化合物番号	構造式	原料グリコサミノグリカン (GAG)
I - (1)		ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、デルマタン硫酸、ヘパリン
I - (2)		コンドロイチン硫酸K、コンドロイチンポリ硫酸
I - (3)		ケラタン硫酸
I - (4)		ケラタンポリ硫酸
II - (1)		ヒアルロン酸、コンドロイチン
II - (2)		コンドロイチン硫酸AもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸、デルマタン硫酸
II - (3)		ケラタン硫酸、ケラタンポリ硫酸
III		ケラタン硫酸、ケラタンポリ硫酸

別紙 1

特許請求の範囲

1. 一般式



を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 P^1 は1級アミノ基を有する燐脂質を示し、

(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、デルマタン硫酸、ヘパリンから還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマタン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、 R^1 は3位に置換し、 R^2 はCOOH基を示し、 R^3 はOH基を示す。

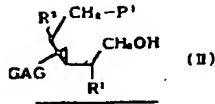
(2) GAGがコンドロイチン硫酸K又はコンド

ロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、 R^1 は3位に置換し、 R^2 はCOOH基を示し、 R^3 はOSO₃H基を示す。

(3) GAGがケラタン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、 R^1 は4位に置換し、 R^2 はCH₂OH基を示し、 R^3 はOH基を示す。

(4) GAGがケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、 R^1 は4位に置換し、 R^2 はCH₂OSO₃H基を示し、 R^3 はOH基を示す。

2. 一般式



を有する糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、P' は1級アミノ基を有する糖脂質を示し、

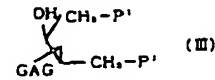
(1) GAGがヒアルロン酸又はコンドロイチンから還元性末端のヘキシサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R' は NHCOCH_3 基を示し、R' はOH基を示す。

(2) GAGがコンドロイチン硫酸AもしくはK、コンドロイチンポリ硫酸又はデルマトン硫酸から還元性末端のヘキシサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R' は NHCOCH_3 基を示し、R' はOSO₃H基を示す。

(3) GAGがケラタン硫酸又はケラタンポリ硫

酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、R' 及びR' はOH基を示す。

3. 一般式

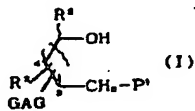


を有する糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、P' は1級アミノ基を有する糖脂質を示し、GAGはケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示す。

別紙2

(I) 一般式



を有する糖脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、P' は1級アミノ基を有する糖脂質を示し、

(1) GAGがヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A、CもしくはE、デルマトン硫酸、ヘパリンから還元性末端のグルクロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、或いはデルマトン硫酸から還元性末端のイズロン酸部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R' は3位に置換し、R' はCOOH基を示し、R' はOH基を示す。

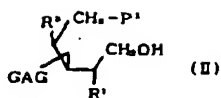
(2) GAGがコンドロイチン硫酸K又はコンドロイチンポリ硫酸から還元性末端のグルクロン酸

部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは4位に、R' は3位に置換し、R' はCOOH基を示し、R' はOSO₃H基を示す。

(3) GAGがケラタン硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R' は4位に置換し、R' はCH₂OH基を示し、R' はOH基を示す。

(4) GAGがケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、GAGは3位に、R' は4位に置換し、R' はCH₂OH、OSO₃H基を示し、R' はOH基を示す。

(II) 一般式



を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 P^1 は 1 級アミノ基を有する燐脂質を示し、

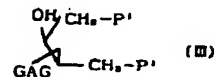
(1) GAG がヒアルロン酸又はコンドロイチンから還元性末端のヘキシサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、 R^1 は $NHCOCH_3$ 基を示し、 R^2 は OH 基を示す。

(2) GAG がコンドロイチン硫酸 A もしくは K、コンドロイチンポリ硫酸又はデルマトン硫酸から還元性末端のヘキシサミン部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、 R^1 は $NHCOCH_3$ 基を示し、 R^2 は OSO_3H 基を示す。

(3) GAG がケラタン硫酸又はケラタンポリ硫

酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基のとき、 R^1 及び R^2 は OH 基を示す。

(III) 一般式



を有する燐脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩。

上記式中、 P^1 は 1 級アミノ基を有する燐脂質を示し、 GAG はケラタン硫酸又はケラタンポリ硫酸から還元性末端のガラクトース部分を除いたグリコサミノグリカン残基を示す。